

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RÉACTION DU MILIEU ET PRODUCTION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

par G. ABT et G. LOISEAU.

(Travail du laboratoire du Dr L. Martin.)

I

Dès les premières études sur la culture du bacille de la diphtérie et sur la production de la toxine, l'existence d'une phase d'acidification, pendant les premiers jours, fut constatée. Roux et Yersin [1], dans leurs premiers mémoires, signalent que « les cultures du bacille de la diphtérie, dans le bouillon de veau légèrement alcalin, deviennent acides dans les premiers jours et qu'elles prennent une réaction alcaline après un temps plus long. Tant que la culture est acide, son pouvoir toxique n'est pas considérable et il est nécessaire d'injecter aux animaux une grande quantité de liquide filtré pour leur donner l'empoisonnement diphtérique aigu. Plus tard, lorsque la culture est alcaline, sa puissance toxique a beaucoup augmenté ».

Pour obtenir une production constante de toxine très active, les efforts des expérimentateurs ont porté sur la suppression de cette phase d'acidification. Dès 1895-1896, deux points renaient spécialement l'attention : qualité de la viande employée (Spronck [2]); taux d'alcalinisation du bouillon (Park et Williams [3]); en 1898 une heureuse synthèse des recherches

antérieures et la préparation d'une peptone de composition constante permettent la préparation et l'étude par L. Martin du bouillon qui est encore utilisé actuellement à l'Institut Pasteur, sans modification sensible, pour la préparation de la toxine diphtérique nécessaire à l'immunisation et à l'entretien des chevaux producteurs de sérum antidiphtérique. En raison de la parfaite adaptation de ce milieu à la production de la toxine diphtérique nous donnons ici son mode de préparation.

*
* *

MACÉRATION DE VIANDE. — La viande employée provient de cuissots de veau de première qualité, viande très blanche, [complètement débarrassée de graisse, de tendons et d'aponévroses.

La viande hachée est mêlée avec le double de son poids d'eau, réchauffée de manière que le mélange soit à une température voisine de 37° (les quantités traitées dans le même récipient varient de 15 à 20 kilogrammes de viande pour 30 à 40 litres d'eau), puis le mélange séjourne environ vingt heures à l'étuve à 37°.

Au sortir de l'étuve, par suite de la fermentation spontanée qui s'est produite, la plus grande partie de la viande est montée à la surface du liquide, sous forme d'un chapeau, dont on se débarrasse sans l'exprimer; le liquide restant constitue la macération de viande.

SOLUTION DE PEPTONE. — Elle est toujours préparée au laboratoire suivant la technique indiquée en 1898 par L. Martin [4].

Les estomacs de porc (panses) dégraissés et lavés sont hachés.

Ce hachis est mélangé avec de l'eau acidulée chauffée à 50°, dans les proportions suivantes :

Eau à 50°	1.000 cent. cubes.
Hachis de panses de porc	200 grammes.
Acide chlorhydrique pur	10 cent. cubes.

Les récipients en terre vernissée ou en grès employés pour cette digestion contiennent de 25 à 30 litres de liquide.

L'eau est maintenue à une température de 50° pendant quinze à dix-huit heures.

Après ce temps écoulé, on chauffe à 100° pour détruire la pepsine en excès et on laisse refroidir. Ce liquide acide constitue une solution de peptone à 4 p. 100; il se clarifie par le repos; décanté deux à trois jours après sa préparation il est prêt à être employé.

BOUILLON. — Au moment de préparer le bouillon on neutralise la quantité de solution de peptone nécessaire, neutralisation qui s'opère à chaud avec la lessive de soude, le papier de tournesol servant d'indicateur; de gros flocons se précipitent et le liquide filtré sur papier donne une solution de peptone parfaitement claire.

Reprenons la macération de veau au sortir de l'étuve, débarrassée de la viande; elle est mélangée à volume égal avec la solution de peptone neu-

tralisée, portée à la température de 100°, puis filtrée sur une chausse en étoffe.

Le liquide filtré est maintenu à une température de 70-80° pour l'alcalinisation avec une solution de soude. On alcalinise, avec la phénolphtaléine comme indicateur, jusqu'au début du virage; la comparaison avec un tube témoin permet de saisir la modification de teinte du milieu dès le début du virage au rose.

Le bouillon alcalinisé est filtré sur papier Chardin, chauffé à l'autoclave pendant trente minutes à 120°, filtré sur papier ordinaire, réparti dans des ballons de Fernbach à la dose de 4.200 cent. cubes par ballon, et chauffé trente minutes à 115° pour la stérilisation.

*
* *

Avec le milieu Martin ainsi préparé, et ensemencé avec le bacille diphtérique Am 8, on obtient une toxine très active; la dose minima qui tue en quatre jours le cobaye de 350 grammes reste à peu près constante d'un bout à l'autre de l'année. Comme on le verra par les chiffres que nous citons plus loin (tableau III), ces variations soudaines et inexplicables de l'activité de la toxine, dont parlent la plupart des auteurs, ne se produisent pas à l'Institut Pasteur. Il semblerait que depuis les travaux de Spronck, de Th. Smith [5], de L. Martin, sur l'influence nocive des sucres de la viande, qu'il faut faire disparaître par une fermentation appropriée, elles ne devraient plus être observées. Nous voyons cependant qu'elles préoccupent non seulement Madsen [6] en 1898 et 1908, mais Mac Conkey [7] à l'Institut Lister en 1912, Bunker [8] en Amérique en 1919, Dernby et Davide [9] à l'Institut sérothérapique de Suède en 1921; et dans la récente publication (1921) de l'Institut de Thérapeutique expérimentale de Francfort sur le contrôle officiel des sérums, dont cet Institut est chargé, Otto et Hetsch [10] disent encore que, sur une série de ballons mis en culture en même temps, une partie sera inutilisable pour la préparation de la toxine-étalon, parce que l'activité du poison restera trop faible.

Cherchant la cause de ces irrégularités, Madsen avait étudié dès 1898 l'influence de la réaction initiale du milieu de culture. Il désignait le titre de ses bouillons par le nombre de centimètres cubes de soude normale qu'il fallait ajouter par litre pour arriver au virage de la phénolphtaléine; et il obtenait ce résultat surprenant que lorsque le titre initial était 18,5 à 20,5,

la culture s'acidifiait davantage, et restait toujours acide; quand le titre était 8,5 à 9, après une phase d'acidification elle devenait toujours alcaline; enfin entre 8,5-9 et 18,5-20,5, tantôt la culture évoluait vers l'acidité, tantôt elle s'alcalinisait plus ou moins rapidement. (Le titre 15 correspond à la neutralité au tournesol. Avec 18,5 on est donc en milieu faiblement acide). Quant à la production de toxine, elle était toujours nulle dans les cultures acides; mais dans les cultures alcalines tantôt elle était satisfaisante, tantôt elle restait très faible, ou même faisait totalement défaut. Ces faits curieux ont été pleinement confirmés, à quelques détails près, par Jacobsen [11], qui refit les expériences sous l'inspiration de Madsen, en 1911. Toutefois Jacobsen reproduisit aussi les résultats de Lubenau [12], qui avait critiqué en 1908 le travail de Madsen, en partie par suite d'une erreur d'interprétation dans la détermination du titre. Lubenau avait montré que si la macération de viande peptonée est soumise au préalable à une fermentation par le *B. coli*, pendant quarante-huit heures, suivant la méthode de Th. Smith, les cultures deviennent alcalines quelle que soit la réaction initiale, tandis que si l'on ajoute à cette macération fermentée 1 p. 100 de glucose, elles s'acidifient fortement. La production de la toxine n'avait pas été envisagée dans ce travail. Jacobsen, qui a repris les expériences de Lubenau, avec les corrections nécessaires, a vu ensuite qu'avec une addition moins forte de glucose, et un titre initial suffisamment alcalin, on pouvait obtenir une phase assez longue d'acidification suivie d'une alcalinisation définitive. On voit que la richesse du milieu en sucre a bien une importance capitale, puisque aussi longtemps que le sucre n'est pas épuisé, il contrarie l'alcalinisation normale de la culture en donnant lieu à la production d'acide. Il y a cependant encore des bactériologistes qui croient utile d'ajouter un peu de sucre à leurs milieux. Ils ne doivent obtenir de toxine que si l'alcalinité initiale est très élevée, ou si le milieu est capable de compenser l'acidité par une production énergique d'alcali.

Ces recherches n'ont pas abouti à préciser toutes les conditions propres à assurer la marche uniforme des cultures; comme le dit Madsen, il semble que des changements importants naissent de très petites causes. Il était indiqué d'étudier

sur le milieu Martin, qui offre l'avantage d'une grande régularité, l'influence de la réaction initiale et les rapports de ses variations pendant la culture avec la production de la toxine.

II

L'un d'entre nous, en 1906, avait essayé de préciser la marche de l'alcalinisation au cours de la culture du bacille diphtérique, en partant de différents taux d'alcalinité. Le procédé de dosage de l'alcalinité par la méthode titrimétrique employé à ce moment, avec le tournesol comme indicateur, ne permit pas d'obtenir des résultats suffisamment constants et comparables pour en tirer des conclusions précises. Sur les graphiques établis avec les taux d'alcalinité journalière, on voyait nettement la baisse de l'alcalinité pendant les vingt-quatre premières heures de culture, suivie d'une ascension progressive du taux de l'alcali jusqu'au dixième jour, date au delà de laquelle les essais n'ont pas été poursuivis.

Depuis l'introduction de la mesure de P_H^+ par la méthode colorimétrique, les études sur la marche de la réaction dans les cultures du bacille diphtérique et ses rapports avec la production de toxine ont été reprises par plusieurs auteurs, et les irrégularités constatées dans la production de la toxine ont été de nouveau attribuées à une réaction défavorable. Bunker [8] constate que la *zone de croissance* est très large et s'étend de P_H^+ 5,6 à P_H^+ 8,8. La zone optima est au contraire très étroite. Il la délimite d'après la rapidité avec laquelle apparaît le voile à la surface des cultures. De P_H^+ 7 à 7,5 le voile se forme en douze à quatorze heures; de P_H^+ 6,7 à 7 et de P_H^+ 7,5 à 7,8 en un jour; au delà de ces limites, il met de deux à quatre jours pour se constituer. La toxine n'est très active que pendant un temps très court, un à trois jours, et quand le P_H^+ est entre 7,85 et 8,25; par exemple dans un milieu composé de macération de viande additionnée de peptone de Witte, la toxine tue à 1/100 de cent. cube le quatrième jour ($P_H^+ = 7,92$), à 1/300 le cinquième jour ($P_H^+ = 8,1$), à 1/200 le sixième jour ($P_H^+ = 8,22$) et à 1/100 le huitième jour ($P_H^+ = 8,3$). Si l'alcalinisation se trouve retardée et atteint seulement 7,41 le neuvième jour, le 1/100 de cent. cube n'amène pas la mort

des animaux et c'est seulement au quatorzième jour que l'on tue avec 1/200 de cent. cube. Il est donc nécessaire, d'après Bunker, de saisir le moment fugitif où l'activité de la toxine est à son maximum et d'ajuster exactement le milieu de manière à traverser la zone de P_H^+ 7,8 à 8,2 entre le cinquième et le huitième jour.

Les conclusions de Dernby et Davide [9] sont à peu près les mêmes. Les limites extrêmes de croissance sont P_H^+ 6 et P_H^+ 8,4. L'optimum, d'après la rapidité de formation du voile, est entre P_H^+ 7,2 et 7,6. L'activité de la toxine au huitième jour est fonction de la réaction au départ. Par exemple avec la race Kling B, on obtient les résultats suivants :

P_H^+	Dose mortelle au 8 ^e jour	P_H^+ au 8 ^e jour
—	—	—
7	1/200	7,8
7,2	1/500	8
7,5	1/400	8,2
7,8	1/200	8,5

Quand la réaction initiale est P_H^+ 7,2, l'activité maxima de la toxine est atteinte le huitième jour. Si l'on part d'un milieu plus acide (P_H^+ 6,8) la plus forte toxine est obtenue le onzième jour. D'autre part une réaction trop alcaline atténue la toxine : la toxicité augmente entre le huitième et le onzième jour si P_H^+ passe de 7,5 à 8; elle diminue si P_H^+ monte de 8 à 8,3; mais c'est à partir de 8,3 et surtout de 8,6 que l'influence défavorable de l'alcalinité se fait sentir.

Dans une deuxième publication Davide et Dernby [13] emploient, pour préparer leur milieu, une macération de viande privée de sucre par fermentation sous l'influence de la levure, puis soumise à une digestion trypsique et additionnée finalement de 1,5 p. 100 de peptone. La réaction optima pour la croissance va avec ce milieu de P_H^+ 6,9 à 7,6, plus large que dans le précédent travail de ces auteurs. Pour la production de la toxine on ajuste le milieu à P_H^+ 7,1 — 7,2; la culture est arrêtée le sixième ou septième jour quand la réaction atteint 8,2. Voici la marche d'une expérience, faite dans des tubes à essai, où l'on remarque la variation rapide du pouvoir toxique.

3 ^e jour	$P_H^+ = 7,2$	1/100
4 ^e —	7,5	1/200

5 ^e jour	$P_{H}^{\pm} = 7,7$	1/333
6 ^e —	7,9	1/2.000
7 ^e —	8	1/2.000
8 ^e —	8,4	1/1.000
9 ^e —	8,6	1/333
10 ^e —	8,7	1/200

Si ces faits étaient vrais dans tous les milieux, ils seraient très importants pour la préparation régulière de toxines très actives. On s'exposerait en effet, d'après ces auteurs, à des mécomptes en se servant pour ajuster la réaction initiale de l'ancienne méthode titrimétrique et du virage de la phénolphtaléine, au lieu d'employer la détermination plus exacte du P_{H}^{\pm} ; et l'on risquerait, en arrêtant les cultures à date fixe, de manquer le moment où la toxine est la plus forte.

Il ne semblait pas que le milieu Martin fût aussi sensible à l'influence de la réaction. Pendant treize semaines, nous avons vérifié le P_{H}^{\pm} du bouillon préparé au Service de Sérothérapie et alcalinisé avec la phénolphtaléine comme indicateur. Il était, au moment de l'ensemencement :

2 fois	= 7,5
9 —	= 7,7 à 7,8
1 —	= 7,9
1 —	= 7,95.

Les écarts du P_{H}^{\pm} , sans être considérables, auraient pu se traduire par des variations dans l'activité de la toxine; il n'en a rien été, comme on le voit par le tableau que nous donnons plus loin (tableau III).

III. — Limite de croissance.

Avant d'entrer dans l'étude de la réaction du milieu dans ses rapports avec la production de la toxine, nous dirons quelques mots des « limites de croissance » du bacille diphtérique dans le bouillon Martin. Nous les avons cherchées en cultivant le bacille diphtérique Am. 8 (Park et Williams) dans des ballons contenant 150 cent. cubes de bouillon ajusté à des P_{H}^{\pm} divers, jusqu'à 9,3 dans la zone alcaline et 5 dans la zone acide.

Les dates d'apparition du voile sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU I.

ZONE ALCALINE			ZONE ACIDE		
P _H INITIAL	FORMATION DU VOILE		P _H INITIAL	FORMATION DU VOILE	
	début	complet		début	complet
8,7	1 jour.	1 jour 1/2.	5,7	2 jours.	Presque complet en 3 jours.
8,8 (1)	2 jours.	2 j. 1/2.	5,6 (1)	Id.	Incomplet (2/3 en 3 jours).
8,9	2 j. 1/2.	3 jours.	5,5	Id.	Id.
9,0	Id.	Id.	5,4	2 j. 1/2.	Id.
9,1	?	3 j. 1/2.	5,3	14 jours.	15 jours (à peu près complet).
9,2	6 j. 1/2.	7 jours.	5,2	21 jours.	22 jours (compl.).
9,3	Pas de voile.	"	5,1	Pas de voile	
			5,0	Id.	

(1) Limites extrêmes de croissance de Bunker.

Quatre jours après l'apparition du voile le P_H⁺ des bouillons alcalins était de 8,55 pour le premier, de 8,7 à 8,9 pour les bouillons ajustés de 8,8 à 9,1. Au dix-septième jour le P_H⁺ du bouillon à 9,3, dans lequel il n'y a pas eu formation du voile, était à 8,9, indice d'un très léger développement.

Pour les bouillons acides, au quinzième jour après l'apparition du voile P_H⁺ oscille entre 8,5 et 8,65; dans les ballons ajustés à 5,1 et 5, dans lesquels le voile ne s'est pas développé, le P_H⁺, examiné après six semaines d'étuve, était resté au même taux : en somme il n'y avait pas eu de culture.

Les taux extrêmes d'acide et d'alcali que le bacille a supportés dans nos cultures dépassent un peu les limites de 5,6 et 8,8 indiquées par Bunker, mais en somme ils ne s'en écartent pas beaucoup.

Dans la période qui s'étend entre l'ensemencement et l'apparition du voile, il faut remarquer que la culture se développe en profondeur, faiblement, et modifie peu à peu la réaction du milieu; dès que cette réaction arrive au point permettant le développement rapide, le voile apparaît et la culture, à partir de ce moment, marche comme si le milieu avait été ajusté

primitivement au taux de la réaction qui vient d'être atteinte, sauf modifications dans les propriétés du microbe que nous n'envisagerons pas ici. Cette période de croissance lente, jusqu'au moment où la réaction est ajustée, a été à la limite de croissance du côté alcalin (9,2) de sept jours, et à la limite du côté acide (5,3 et 5,2) de quatorze à vingt et un jours.

IV. — Réaction et production de la toxine.

L'étude des rapports de la réaction avec la production de la toxine dans le milieu Martin nous amènera à une opinion, sur l'importance de la réaction, qui s'écarte en plusieurs points de celle des auteurs cités, et nous permettra de tirer quelques conclusions sur la valeur du milieu employé à l'Institut Pasteur pour la préparation de la toxine diphtérique. Nous avons de plus observé des faits qui n'avaient pas encore été signalés, et dont l'existence pose des questions auxquelles nous espérons que des recherches en cours apporteront une réponse expérimentale.

TECHNIQUE. — Le mélange de macération de viande et de solution de panse qui constitue le bouillon Martin est ajusté au P_H^+ voulu, chauffé une première fois à l'autoclave, filtré sur papier, et placé dans de larges ballons à fond plat (ballons Fernbach) à raison de 1.200 cent. cubes environ par ballon (1).

Pour faire des prélèvements journaliers, sans risque de contamination, on enfonce le coton dans le col du ballon et dispose au-dessus un bouchon de caoutchouc qui porte un tube en siphon dont une branche traverse le coton et plonge dans le liquide, tandis que l'autre se termine par une longue effilure fermée à la lampe. Un second tube coupé juste au-dessous du bouchon de caoutchouc, et muni d'un coton, permet de souffler doucement pour amorcer le siphon ou d'aspirer pour ensemen-
cer par l'effilure.

Avant d'ensemencer, on fait un premier prélèvement pour vérifier le P_H^+ , qui a pu changer à la stérilisation. Certains

(1) Dans les cultures en petits ballons sur 100 cent. cubes par exemple, et à plus forte raison en tubes, les changements de la réaction sont plus rapides, et la production de la toxine est moins régulière.

auteurs ont observé, en effet, des variations très sensibles de la réaction pendant le chauffage à l'autoclave. Sur une série de 21 ballons, de P_H^+ 5,8 à 9, que nous avons ajustés avant la stérilisation et vérifiés après, 8 n'ont pas varié; 1 a changé, dans le sens de l'acidité, de P_H^+ 0,05; 7 de P_H^+ 0,4; 2 de P_H^+ 0,2; 2 de P_H^+ 0,25; 1 enfin est passé de P_H^+ 6,8 à 6,9. Dans d'autres titrages portant sur les 50 litres de bouillon préparé chaque semaine pour le Service de Sérothérapie, nous avons vu quelquefois le P_H^+ rester le même, d'autres fois il baissait de 0,1 à 0,2, exceptionnellement jusqu'à 0,4. On se rend compte qu'il ne peut pas y avoir de régularité dans ces variations en analysant leurs causes : 1° si le milieu est riche en sels ammoniacaux et fortement alcalin, il perd de l'ammoniaque; par exemple pour une culture âgée de trente jours l'ammoniaque, calculée en NH^3 par litre, passe à la stérilisation de 490 milligrammes à 388 milligrammes; dans un autre cas analogue de 371 milligrammes à 238 milligrammes; 2° il peut aussi se former de l'ammoniaque par réaction de certains éléments du milieu sur les protéiques; ainsi un bouillon (nonensemencé) contenait 263 milligrammes de NH^3 par litre avant la stérilisation et 297 milligrammes après; 3° si le milieu contient de l'anhydride carbonique libre ou des bicarbonates alcalins ou alcalino-terreux, il s'alcalinise par perte de CO^2 ; même fait pour les autres acides volatils; 4° l'équilibre qui maintenait en solution des ions phosphate et des ions Ca ou Mg sous la forme de sel secondaire est détruit à la température de stérilisation; il se précipite des sels tribasiques, pendant qu'il reste en solution des sels monobasiques, à réaction acide; 5° les sucres, ou matières amylacées faciles à saccharifier, fournissent des produits acides, si le milieu est franchement alcalin; 6° les peptones subissent un certain degré d'hydrolyse, qui multiplie les groupes $COOH$ ou NH^3 libres, et par suite augmente l'action de tampon de ces substances. Cette énumération n'épuise certainement pas la liste des facteurs qui interviennent pour modifier le P_H^+ . Ils se compensent plus ou moins. On comprend que le résultat doit dépendre dans chaque cas particulier de la composition du milieu, des fermentations qu'ont subies ses éléments, de la réaction choisie, de la température et de la durée du chauffage. Cependant il est vraisemblable que les

changements soient d'autant plus accentués qu'on s'éloigne davantage de la neutralité.

Tous les jours pendant une douzaine de jours, moins fréquemment ensuite, on prélevait du liquide de culture et mesurait le P_H^+ après filtration sur bougie Chamberland L. 3. Nous nous sommes assurés que cette filtration sous une aspiration très faible (5 à 10 centimètres de Hg) ne modifiait pas le P_H^+ . Les mesures étaient faites par la méthode colorimétrique, avec l'échelle de Clark et Lubs. Un certain nombre de lectures ont été contrôlées par la méthode électrométrique; les différences étaient en moyenne inférieures à 0,05 et c'est généralement la méthode colorimétrique qui donnait le chiffre le plus haut quand il n'y avait pas concordance parfaite.

Périodiquement (voir le tableau II) nous avons pratiqué des inoculations au cobaye pour connaître la valeur de la toxine.

Les animaux employés pesaient en général 350 grammes; dans les cas où le poids était différent, on calculait la quantité de toxine à injecter de manière que son rapport au poids du cobaye soit le même que celui du taux envisagé au poids de 350 grammes. Toutes nos doses mortelles de toxine doivent être multipliées par 1,4 pour donner la dose qui tue le cobaye de 250 grammes; la dilution 1/700 devient ainsi 1/1.000 environ. Nous n'avons tenu compte que des animaux morts au plus tard le cinquième jour après l'inoculation. Au delà de ce délai, les lésions caractéristiques de l'intoxication diphtérique aiguë manquent toujours. Déjà au cinquième jour, elles sont incomplètes; si l'on observe encore une légère congestion des capsules surrénales, l'épanchement pleural et la congestion pulmonaire font défaut. On peut dire que l'intoxication diphtérique ne fait sa preuve, à de rares exceptions près, que chez les cobayes morts dans les quatre-vingt-seize heures qui suivent l'inoculation. Ces cas sont donc les seuls qui puissent servir de mesure précise à l'activité des toxines.

* *

Le but de nos premiers essais était de comparer la production de toxine dans le bouillon Martin, ajusté à P_H^+ 7,8 correspondant au taux moyen d'alcalinisation employé dans le

laboratoire (voir tableau III), et dans le bouillon ajusté à P_H^+ 7, titre correspondant au taux d'alcalinisation que l'on obtenait, en moyenne, autrefois à l'Institut Pasteur en ajoutant 7 cent. cubes de soude normale par litre après neutralisation au tournesol.

Nous avons observé un léger retard dans la formation du voile, douze heures environ, dans les ballons à P_H^+ 7,8, par rapport à P_H^+ 7; retard plus marqué quand le P_H^+ initial est au-dessus de 7,8 (voir fig. 3). En outre l'aspect du voile est

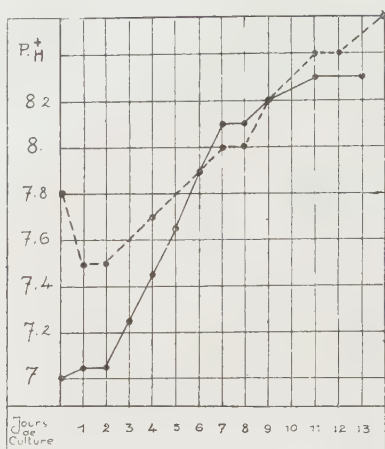


FIGURE 1.

différent. A 7 et au-dessous il est blanc, craquelé, tombe par petits fragments et se reforme mal. Autour de 7,8 il est épais, lourd, semi-transparent; il se fend suivant de larges scissures traversant tout le ballon, tombe en se repliant sans se fragmenter, et se reforme bien.

Pour donner à cet aspect physique des cultures son importance réelle, il faut remarquer que le bacille employé est entraîné depuis plusieurs années à une alcalinité voisine de P_H^+ 7,8 et que c'est le même germe qui brusquement a été transporté dans un bouillon à P_H^+ 7; ajoutons que ces différences n'impliquent pas nécessairement que la toxine ne soit pas produite aussi abondamment dans les deux cas, on le verra par la suite.

La marche de la réaction dans les bouillons à P_H^+ 7 et 7,8 n'est pas la même dans les premiers jours (fig. 1).

En partant de 7 elle monte légèrement ou ne varie pas pendant vingt-quatre heures; puis ascension régulière qui amène le P_H^+ à 7,4-7,6 le quatrième jour.

En partant de 7,8 baisse pendant un ou deux jours jusque vers 7,5, puis ascension lente pour arriver à 7,6-7,7 le qua-

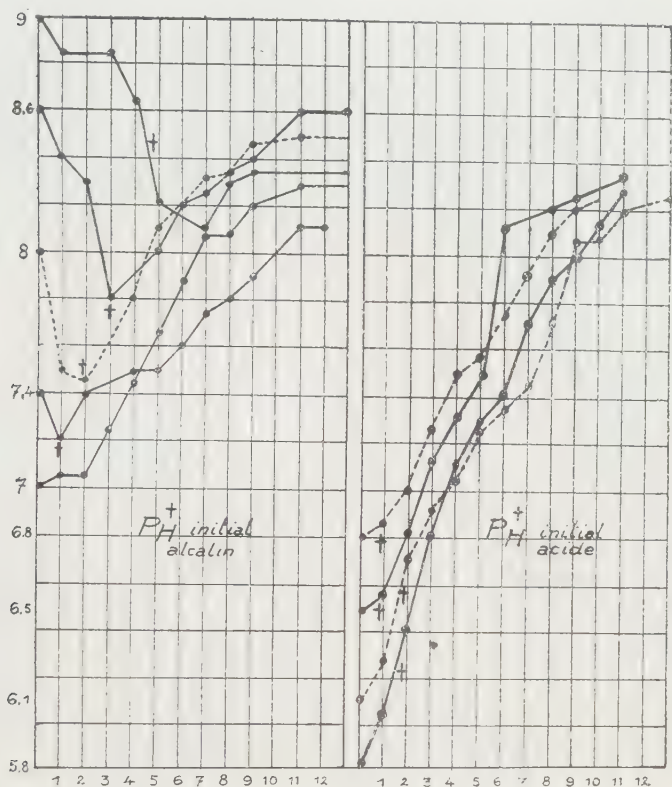


FIGURE 2.

(Les signes + indiquent l'apparition du voile).

trième jour. Les graphiques des deux milieux tendent ensuite à se rapprocher; souvent ils se confondent ou même se croisent du sixième au onzième jour.

L'opposition s'accroît pendant les premiers jours si l'on ajuste le milieu à une réaction plus acide que 7 ou plus alcaline que 7,8 (fig. 2). L'ascension est plus rapide dans les ballons plus acides, qui passent de 6 à 7 en quatre jours; la chute est

plus forte dans les ballons plus alcalins; 8,6 par exemple tombe à 7,8 en trois jours.

De plus la période d'acidification est d'autant plus longue que l'alcalinité initiale est plus forte, parce que le départ de la

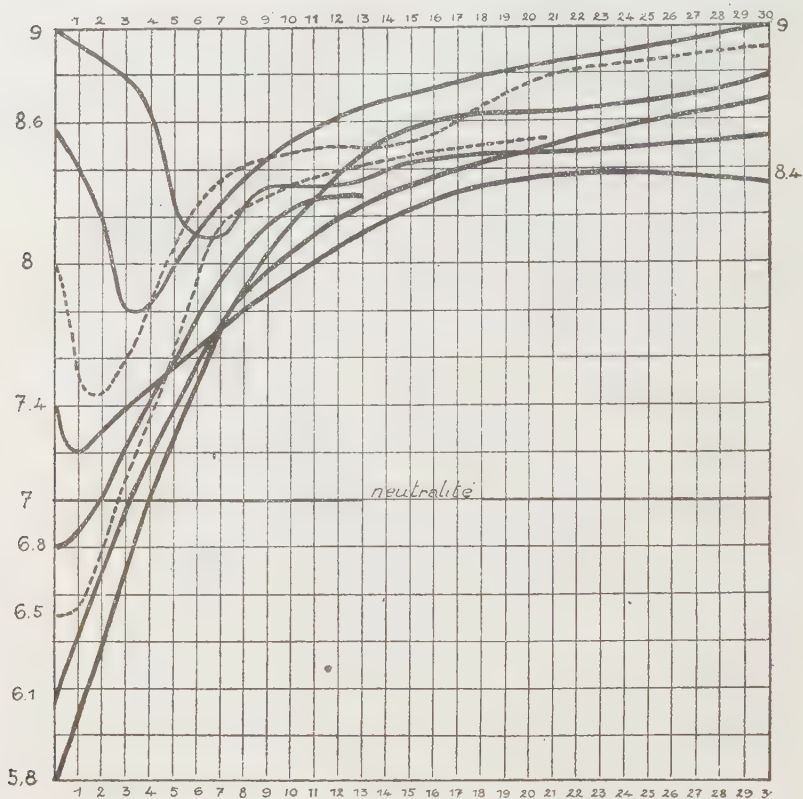


FIGURE 3.

culture est plus lent et la production du voile plus tardive. L'angle des graphiques qui marque le changement de réaction se déplace vers la droite à mesure que le P_H^+ initial est plus haut.

Vers le onzième jour, au moment de la récolte de la toxine, les différences de P_H^+ sont faibles; la réaction oscille entre 8,15 et 8,35, exceptionnellement 8,6. Les courbes de la figure 3 indiquent la marche générale de la réaction pendant un mois, avec un P_H^+ initial variant de 5,8 à 9.

Il semble que le bacille diphtérique ait le pouvoir de corriger la réaction du milieu en créant des conditions plus favorables à son développement. Nous ne nous arrêterons pas à cette interprétation qui ferait appel à la cause finale pour expliquer des phénomènes biochimiques. Mais il serait fort intéressant de montrer que la nutrition du microbe ne s'alimente pas des mêmes substances, ou n'aboutit pas aux mêmes produits de désintégration, selon que le milieu est acide ou alcalin. Nous avons commencé l'étude de cette question, et tiré des premières expériences d'orientation un aperçu nouveau sur les facteurs principaux de l'acidification et de l'alcalinisation.

D'abord la réaction à un moment donné n'est qu'une différence entre l'acide et l'alcali produits par les échanges nutritifs du microbe. Elle évolue vers l'alcalinisation ou l'acidification selon que l'un l'emporte sur l'autre; et c'est précisément parce que les deux contraires s'accroissent concurremment que l'on observe dans les courbes de la réaction des inflexions, des paliers : il n'y a pas arrêt de l'activité, mais avance momentanée de l'acide sur l'alcali, ou réciproquement. Ces faits, qui ont probablement un caractère général, ont été jusqu'à présent complètement négligés lorsqu'on parle de l'action d'un microbe sur un milieu. On dit qu'il alcalinise, ou qu'il acidifie; mais souvent les bactériologistes sont désorientés par des réactions incertaines, ou même inversées. Ce n'est pas le microbe qui change de propriété, c'est seulement un facteur qui devient prépondérant, alors que dans les conditions les plus fréquentes il était au second plan. Ainsi dans nos cultures pendant que le P_{H}^{+} passe, en quatre jours, de 8,6 à 7,9, l'ammoniaque libérable par distillation sur MgO augmente de 62 milligrammes par litre (127 à 189), à peu près dans les mêmes proportions que lorsque le milieu s'alcalinise de 5,9 à 7,05.

Mais il y a parallèlement une production d'acide qui masque celle d'ammoniaque. Il est possible, nous n'avons pas encore vérifié le fait, qu'il y ait de même dans les milieux ajustés à P_{H}^{+} 6 ou 7, qui ne présentent pas de phase d'acidification, une production d'acide qu'une quantité plus forte d'alcali nous empêche de discerner.

Il est classique d'attribuer l'alcalinisation des cultures à la

TABLEAU II.

Activité de la toxine diphtérique dans le milieu Martin
ajusté à des P_H^+ compris entre 5,8 et 9.

RÉACTION INITIALE	CULTURE de	RÉACTION au moment DE L'ESSAI	DOSE MORTELLE	MORT EN	RÉACTION INITIALE	CULTURE de	RÉACTION au moment DE L'ESSAI	DOSE MORTELLE	MORT EN
	Jours					Jours			
5,8	4	7,1	1/100	Survit.	7,4	1	7,2	1/10	2 j. 1/2
	8	7,9	1/100	Survit.		4	7,5	1/300	2 j. 1/2
	14	8,4	1/10	2 j. 1/2		7	7,75	1/500	2 j. 1/2
6,1	4	7,05	1/200	Survit.		12	8,15	1/700	4 j. 1/2
	11	8,2	1/100	Survit.					
6,3	4	7,2	1/200	1 j. 1/2	7,7	1	7,5	1/10	2 j. 1/2
	7	7,6	1/300	4 jours		4	7,75	1/700	2 j. 1/2
	25	8,4	1/100	2 j. 1/2		7	7,95	1/700	5 jours
6,3	4	7,1	1/200	3 j. 1/2		12	8,3	1/500	2 j. 1/2
	11	8,25	1/200	4 j. 1/2		30	8,7	1/300	2 j. 1/2
	30	8,9	1/100	3 j. 1/2					
6,5	4	7,35	1/200	Survit.	7,8	1	7,5	1/10	4 j. 1/2
	11	8,35	1/200	2 j. 1/2		4	7,7	1/300	2 j. 1/2
	30	8,85	1/100	4 j. 1/2		7	8	1/700	3 j. 1/2
6,8	5	7,55	1/500	2 jours		30	8,7	1/300	4 j. 1/2
	8	8,1	1/700	2 j. 1/2	7,9	4	7,6	1/300	2 jours
	11	8,25	1/700	Survit.		8	8,2	1/500	2 j. 1/2
	21	8,7	1/500	4 j. 1/2					
	31	8,65	1/200	4 jours					
6,9	1	6,9	1/10	2 j. 1/2	8,2	4	7,9	1/300	2 j. 1/2
	4	7,4	1/300	3 jours		7	8,2	1/500	2 j. 1/2
	7	7,7	1/700	4 jours		25	8,4	1/300	2 j. 1/2
	30	8,5	1/300	2 j. 1/2					
7	5	7,65	1/500	2 jours	8,6	4	7,9	1/500	3 j. 1/2
	8	8,1	1/700	3 j. 1/2		8	8,35	1/700	4 j. 1/2
7,05	1	7,2	1/10	1 j. 1/2		14	8,7	1/500	2 jours
	2	7,3	1/50	1 j. 1/2		30	9	1/200	1 j. 1/2
	4	7,6	1/500	2 j. 1/2	9	4	8,65	1/10	Survit.
	6	7,8	1/500	3 jours		6	8,15	1/300	4 j. 1/2
	12	8,4	1/500	3 jours		11	8,35	1/300	1 j. 1/2

désamination des protéiques, qui met en liberté de l'ammoniaque. Plusieurs auteurs cependant ont indiqué, sans grands détails, que ce facteur n'est pas le seul. Dans nos cultures il n'est même pas le plus important. Nous nous en sommes rendu compte de deux manières :

1° Si l'on calcule d'une part la quantité d'ammoniaque qu'il faut ajouter au bouillon avant l'ensemencement pour l'amener à une alcalinité donnée, P_H^+ 8,5 par exemple, et que l'on dose d'autre part la quantité d'ammoniaque qui s'est formée dans la culture entre le départ et le moment où elle a atteint ce P_H^+ , on trouve entre les deux chiffres un écart considérable, qui révèle un déficit en ammoniaque dans la culture. Les deux exemples suivants représentent l'un une différence faible, l'autre une différence forte (car les chiffres varient beaucoup d'une culture à l'autre), en milligrammes de NH^3 par litre.

Ammoniaque formée	215	Calculée	323
—	325	—	588

L'alcalinité qu'il faut rapporter à une autre cause que l'ammoniaque est encore plus importante que ne l'indiquent ces chiffres, puisque ces dosages, dans lesquels l'ammoniaque était estimée par distillation sur MgO , nous donnaient la totalité des sels ammoniacaux, et pas seulement l'ammoniaque libre qui seule influe sur le P_H^+ . La différence est de 1/10 à 1/4, à retrancher.

2° Supposant que l'alcalinité était due pour une part à la formation de carbonate de soude, nous avons préparé un bouillon qui contenait un minimum de sels de soude, c'est-à-dire seulement ceux qui provenaient de la viande et des pansees de porc. Nous avons remplacé dans la digestion pepsique de la panse l'acide chlorhydrique par l'acide sulfurique, qu'il était facile d'éliminer par la baryte, puis amené le milieu à la réaction voulue par addition d'ammoniaque au lieu de soude. Puis nous avons placé comparativement dans des dessiccateurs 20 cent. cubes de culture du trentième jour sur le bouillon ordinaire d'une part, et sur ce bouillon sans soude d'autre part. Ces liquides étaient additionnés de 1 cent. cube de solution à 10 p. 100 de cyanure de mercure, pour éviter les fermentations, et surmontés de capsules contenant de l'acide sulfurique $N/10$,

comme pour faire un dosage de l'ammoniaque par la méthode à la cloche de Schlœsing. Les dessiccateurs sont restés à l'étuve à 36° jusqu'à ce que l'acide sulfurique, plusieurs fois renouvelé, n'absorbe plus d'ammoniaque. Or pour le bouillon ordinaire le P_H^+ qui était de 9 avait passé à 8,7 après élimination de NH^3 ; le bouillon sans soude (ou plutôt pauvre en Na) était tombé de 8,75 à 7,25. Du reste la quantité de NH^3 recueillie sur SO_4H^2 était plus élevée dans le premier cas que dans le second.

Sur l'origine du carbonate de soude nous n'avons encore qu'une hypothèse, que nous nous proposons de vérifier; il proviendrait des sels de soude d'acides organiques, acétates, butyrates, etc., que le bacille diphtérique transformerait en carbonates, comme le ferait une calcination. Par l'examen des quantités d'ammoniaque formées dans les divers segments de la courbe d'alcalinisation, on voit que ce facteur joue dans la zone de P_H^+ 6 à 7, et aussi au-dessus de 8. Il faut donc en entreprendre l'étude approfondie pour se faire une idée exacte de son intervention. Remarquons toutefois que ces sels n'existent qu'en petite quantité, et peut-être à la faveur surtout de notre mode spécial de préparation de la macération de viande. Ils joueraient alors un rôle important dans le succès du milieu que nous employons, et nous connaîtrions une des raisons pour lesquelles nos résultats diffèrent de ceux des autres auteurs.

Nous avons aussi des indications intéressantes sur la nature de l'acidification que nous observons dans les milieux dont l'alcalinité dépasse 7,3 à 7,4 environ. Elle pourrait bien être différente de celle que l'on obtient, quelle que soit la réaction initiale, dans les milieux qui contiennent du sucre ou des substances saccharifiables. Il est certain, comme on le verra plus loin par les expériences dans lesquelles nous avons essayé d'ajuster de la toxine filtrée à divers P_H^+ , qu'il s'accumule du CO^2 dans les cultures. Si le milieu est acide, une faible proportion reste à l'état de $H^2 CO^3$ et apporte au milieu une très légère acidité; le reste est dissous sous la forme CO^2 et n'influe pas sur la réaction; le gaz carbonique se dégage peu à peu dans l'atmosphère. Si au contraire le milieu est alcalin, il forme du carbonate, puis du bicarbonate, et par suite l'alcalinité diminue. Les expériences directes que nous instituons pour

démontrer ces faits ne sont pas terminées ; mais nous savons que lorsque l'on arrête une culture, dès le onzième jour elle contient tout l'alcali nécessaire pour porter le P_H^+ à 9, bien que la réaction soit régulièrement 8,4 à 8,55 au plus. Il suffit de filtrer sur bougie Chamberland et de mettre vingt-quatre heures à l'étuve pour obtenir le $P_H^+ = 9$. Si l'on adapte au ballon contenant la toxine filtrée un tube qui va plonger dans une solution de baryte, en milieu bien clos, on peut recueillir du carbonate de baryte. Dans une expérience rapide d'orientation, nous avons obtenu une quantité de CO_2 correspondant à 131 milligrammes par litre, pendant que le P_H^+ passait de 8,55 à 9. Ces constatations n'épuisent pas la question. Il faut montrer que CO_2 est produit dès les premiers stades de la culture, chercher s'il est le seul acide qui apparaisse dans les milieux à réaction initiale alcaline, et bien d'autres problèmes dont l'ensemble sollicite notre curiosité. Nous croyons cependant qu'une place importante devra être faite à l'acide carbonique.

TABLEAU III.

	P_H INITIAL	ESSAI DE LA TOXINE au 11 ^e jour			P_H INITIAL	ESSAI DE LA TOXINE au 11 ^e jour	
		dose	mort en			dose	mort en
9 mai 1921.	7,7	1/500 1/700	2 jours 1/2. 6 jours.	27 juin.	7,75	1/500 1/700	2 jours. 4 jours.
16 mai.	7,9	1/300 1/500	2 jours. 2 jours 1/2.	4 juillet.	7,75	1/500 1/700	2 jours 1/2 4 jours.
23 mai.	7,8	1/400 1/700	1 jour 1/2. 4 jours.	11 juill.	7,8	1/500 1/700	3 jours 1/2. 6 jours.
30 mai.	7,9	1/500 1/700	2 jours 1/2. 3 jours.	18 juill.	7,8	1/500 1/700	2 jours 1/2. 3 jours 1/2.
13 juin.	7,75	1/500 1/700	3 jours 1/2. 6 jours 1/2.	25 juill.	7,55	1/500 1/700	2 jours 1/2. 3 jours.
20 juin.	7,75	1/500 1/700	3 jours. 3 jours 1/2.	1 ^{er} août.	7,55	1/500 1/700	3 jours 1/2. 6 jours.

Disons aussi que nous n'attribuons aucune valeur aux variations de P_H^+ que nous avons observées dans les cultures au delà du terme 8,5 environ; elles peuvent provenir non pas d'une production nouvelle d'alcali, mais seulement du départ occasionnel de CO_2 .

Il résulte de cet ajustement de la réaction par le bacille diphtérique, cultivé en bouillon Martin, que l'activité de la toxine que nous obtenons est sensiblement la même (0,002 à 0,0014) vers le 7^e-8^e jour, quand le P_H^+ initial est compris entre 6,8 et 7,8 (tableau II).

De P_H^+ 6,8 à 7,1 sur cinq expériences trois fois la toxine tuait au 1/700 de cent. cube, et deux fois au 1/500 en deux jours et demi (limite mortelle environ 1/600).

Sur trois expériences de 7,7 à 7,9, la toxine tuait deux fois au 1/700, et une fois au 1/500 en deux jours et demi; pour cette même zone de P_H^+ , qui correspond à l'alcalinité habituelle du bouillon préparé au laboratoire, le tableau ci-dessus donne la valeur de la toxine et le P_H^+ initial, pendant douze semaines.

Au moment de l'activité maxima de la toxine, du quatrième au huitième jour, la réaction est entre 7,7 et 8,3, zone un peu plus large que celle de Bunker et Dernby.

Examinons ce qui se passe en dehors de la zone 6,8 à 7,8.

MILIEUX ALCALINS. — Avec un P_H^+ de 8,6 au départ, la réaction descend à 7,9 le quatrième jour; déjà 1/500 de toxine tue en trois jours et demi; le huitième jour la réaction est remontée à 8,35 et la toxine tue au 1/700; en somme production de toxine aussi rapide et aussi forte qu'en partant de 7 ou 7,8. Si le P_H^+ initial est 9, la courbe descend à 8,6 au quatrième jour; à ce moment le voile commence à peine à se former, le liquide filtré ne tue pas au 1/10 de cent. cube. Au sixième jour le P_H^+ est à 8,15 et la toxine tue au 1/300; le voile est complet depuis trente-six heures et la baisse du taux d'alcalinité n'est pas encore terminée (voir fig. 2). Dans la zone alcaline 8,6 paraît être la limite au delà de laquelle il se forme très peu de toxine; de plus une partie de la toxine formée est probablement détruite; nous reviendrons plus loin sur ce point.

MILIEUX ACIDES. — Avec P_H^+ 6,8 au départ, la toxine présente

encore son maximum d'activité vers le huitième jour (1/700 tue en deux jours et demi). Pour une acidité de 5,8 à 6,4 il ne se forme qu'une petite quantité de toxine, de l'ordre de 1/10 de centimètre cube. Si P_H^+ initial est 6,3 ou 6,5, la toxine formée ne tue pas au delà du 1/200 depuis le quatrième jour, sauf une fois au 1/300 le septième jour. Cependant en partant de 6,5, le voile est bien formé à la fin du premier jour; le deuxième jour P_H^+ est à 6,8, réaction qui permet, comme nous l'avons vu ci-dessus, une production de toxine très active. La valeur P_H^+ 6,8 paraît donc être un seuil au-dessous duquel le bacille ne trouve pas les conditions favorables au développement de sa fonction toxigène. Mais de plus, et c'est là le fait intéressant, qui n'avait pas encore été entrevu, et qui peut devenir un point de départ nouveau, pour étudier l'origine de la toxine, *il suffit que le bacille diphtérique ait végété deux jours à deux jours et demi au-dessous de 6,8, réaction à laquelle la multiplication des germes n'est en apparence pas entravée, pour qu'il soit incapable de fournir plus tard entre 6,8 et 8,4 une bonne toxine.* En se reportant à nos courbes on verra que même lorsque le P_H^+ initial est 5,8 à 6,4 et que l'activité de la toxine obtenue ne dépasse jamais 1/10 de centimètre cube, la réaction à la fin du troisième jour de culture est déjà 6,7 à 6,9.

On peut se demander si ce n'est pas l'acidité du milieu qui détruit la toxine à mesure qu'elle est produite. Cette question nous a amenés à étudier l'influence de l'alcalinité et de l'acidité sur la toxine, en ajustant à une réaction acide ou alcaline choisie de la toxine recueillie au onzième jour et filtrée sur bougie, expérience très simple en apparence, mais en fait très difficile à réaliser. Partant d'une toxine dont le P_H^+ était 8,45, nous avons déterminé par un titrage les quantités d'acide chlorhydrique N/10 à ajouter pour obtenir des $P_H^+ = 7,65$ et 6. Puis nous avons placé vingt-quatre heures à l'étuve à 37° des portions de 20 cent. cubes de toxine, pour nous assurer qu'elles avaient été réparties sans contamination; et nous avons ensuite introduit dans les ballons les quantités calculées de HCl, stérilisées au préalable en tube scellé. Lorsque après quelques jours d'étuve nous avons voulu essayer l'activité des toxines ainsi traitées, nous avons constaté que le P_H^+ avait varié de la manière suivante :

<div> <div> Toxine + 2 c.c. eau distillée.</div> <div>— ajustée à $P_H^+ = 7$.</div> <div>— — — — —</div> <div>— — — — —</div> </div>	<div>P_H^+</div> <div>8,65</div> <div>8,3</div> <div>7,3</div> <div>6,3</div>
--	--

Une série d'essais montrait ensuite que la toxine dont le P_H^+ au onzième jour est régulièrement 8,45 à 8,55 passe à 8,7 après quatre ou cinq jours de séjour à la glacière, et généralement à 9 après vingt-quatre heures seulement à l'étuve. En même temps le séjour à l'étuve, sans addition de réactifs destinés à modifier le P_H^+ , c'est-à-dire en somme à la réaction $P_H^+ = 9$, atténue immédiatement la toxine dans de fortes proportions, la dose mortelle tombe en moyenne de 1/700 à 1/200.

C'est évidemment à l'existence de CO_2 libre, et de bicarbonate, qu'il faut attribuer ces variations de P_H^+ . Lorsqu'on ajoute de l'acide chlorhydrique, on décompose les bicarbonates et l'acide carbonique, auquel les indicateurs colorés de la série de Clark et Lubs sont très sensibles, ne s'échappe que lentement du milieu. Nous avons donc cherché à déterminer les quantités d'acide à ajouter pour obtenir un P_H^+ donné, en chassant au fur et à mesure CO_2 par ébullition dans le vide. L'opération a l'allure suivante. On part de 25 ou 30 cent. cubes de toxine, ajuste à un P_H^+ , chasse CO_2 , prélève 5 cent. cubes pour vérifier la réaction obtenue et calcule par un nouveau titrage l'acide à ajouter, chasse à nouveau CO_2 après cette addition, etc... Exemple pour 5 cent. cubes.

Hcl ajouté	P_H^+		P_H^+
1. 1 c.c. 25 N/10.	7	<div> <div>Chassé CO_2</div> <div>—</div> <div>—</div> <div>—</div> <div>—</div> </div>	7,3
2. 0 c.c. 35	6,8		7,45
3. 0 c.c. 3	6,8		6,95
4. 0 c.c. 15	6,8		6,9
5. 0 c.c. 1	6,8		6,8

On voit qu'il a fallu cinq additions successives d'acide pour arriver à une réaction stable, en apparence encore. En effet, nous ajoutons à 20 cent. cubes de toxine la quantité totale d'acide déterminée par les essais successifs; nous relions à une trompe qui ne laisse subsister qu'une pression de 10 à 15 millimètres de mercure, pendant quinze minutes, en plongeant le ballon dans un bain-marie à 35° dès que le dégagement

gazeux n'est plus tumultueux, et nous mettons à l'étuve à 37°. Pour des échantillons ajustés à $P_H^+ = 6$, la réaction devient encore $P_H^+ = 6,15$ au bout de six heures, 6,15 après vingt-quatre heures, 6,25 à 6,3 après deux jours et quatre jours. Il semble y avoir encore soit un peu de CO_2 énergiquement retenu dans le milieu pendant l'action du vide, soit d'autres acides qui, à la température de l'étuve et sous l'influence des protéiques, sont neutralisés ou passent à un état moins dissocié. Toujours est-il que nous ne sommes pas encore en mesure de soumettre une toxine pendant quatre ou cinq jours à 37° à l'action d'une acidité ou d'une alcalinité rigoureusement déterminées. Nous avons l'intention de reprendre en détail l'étude de la baisse de la toxicité pendant les premières heures et les premiers jours après la filtration de la toxine, à l'étuve et à la glacière; la pénurie d'animaux rend ce travail un peu difficile. Il nous semble que le séjour de vingt-quatre heures dans l'étuve, auquel nous soumettions la toxine avant de l'ajuster, pour nous assurer qu'elle a été répartie sans contamination, suffit déjà à l'atténuer notablement. La baisse de la toxicité qui se produit ensuite sous l'influence des diverses alcalinités que nous avons essayées, c'est-à-dire avec un P_H^+ de 8 à 9, existe, mais n'est pas considérable. Entre 7 et 7,5 la toxine paraît se conserver mieux; nous n'avons pas répété l'expérience assez souvent pour être certains que les résultats que nous avons observés sont constants. Quant à l'influence de l'acidité, entre 6 et 6,4 environ, elle n'a rien de brutal; nous avons obtenu deux fois de la toxine qui tuait à 1/200 après une semaine de séjour à l'étuve entre 6 et 6,3. Il n'est pas possible que ce soit la destruction de la toxine par l'acidité qui empêche d'obtenir une toxine tuant à plus de 1/10 de centimètre cube quand le P_H^+ initial est 6,1. Du reste lorsque la réaction initiale est ajustée entre 6,8 et 7,8, on obtient après vingt-quatre heures une toxine qui tue à 1/10 de centimètre cube; après quarante-huit heures, elle ne tue encore qu'à 1/50, et c'est seulement entre le deuxième et le quatrième jour que le taux s'élève vivement. Il n'aurait donc pas pu se former beaucoup de toxine pendant la courte période où le P_H^+ des milieux acides est au-dessous de 6,5 à 6,8.

Nous restons donc en présence de ce fait inattendu : dans un

milieu où le bacille diphtérique a végété pendant deux ou trois jours avec une réaction dont le $P_{\frac{H}{H}}$ est inférieur à 6,8 environ, il est impossible d'obtenir une production normale de toxine, même lorsque la réaction est devenue la plus favorable. Est-ce le bacille qui a perdu la propriété de « sécréter » la toxine? Est-ce le milieu qui ne lui fournit plus l'élément dont il fabrique la toxine, élément qui n'existerait dans le milieu qu'en quantité limitée? La question ainsi posée est très importante, car elle nous amène à chercher la solution de l'origine de la toxine diphtérique. Est-elle un produit de sécrétion ou d'excrétion du microbe, résultat fatal de la vie microbienne quel que soit l'aliment offert, ou bien tire-t-elle son origine d'un élément du milieu que le bacille amène à un stade déterminé de désintégration ou de transformation?

*
* *

Dans la description classique de la marche des cultures du bacille diphtérique, on disait qu'il y avait une première phase d'acidification, pendant laquelle il se forme peu ou pas de toxine; puis que après quelques jours la production d'acide cesse pour faire place à une alcalinisation progressive, la toxine augmentant d'activité à partir du moment où la marche de la réaction est renversée. Cette description est peut-être exacte pour certains milieux et avec certaines réactions initiales. Nous avons vu que si l'on apprécie la réaction par la mesure du $P_{\frac{H}{H}}$, on peut ne pas observer de phase d'acidification. De plus il se forme de la toxine, dans certaines zones, pendant que le milieu s'acidifie; par exemple pendant que le $P_{\frac{H}{H}}$ passait de 8,6 à 7,9, nous avons obtenu en quatre jours une toxine qui tuait à 1/500, exactement comme dans le cas où le $P_{\frac{H}{H}}$ passe de 6,8 à 7,55. Ce n'est donc pas le fait de l'alcalinisation en lui-même qui est la condition d'une bonne production de toxine. Il se pourrait toutefois que l'apparition de la toxine fût liée à des processus biochimiques dont la formation de produits à réaction alcaline serait un des stades, mais que dans le cas que nous venons de citer ces produits fussent neutralisés par les acides formés en même temps.

La meilleure toxine est en général recueillie vers le septième-

huitième jour, quelquefois dès le quatrième, quelquefois seulement le onzième ou douzième jour. Mais ces variations ne sont pas liées à la réaction initiale de la culture, ni au $P_{\frac{1}{2}}$ établi au moment de la récolte. Si l'on se reporte au tableau des essais de toxine que nous donnons ci-dessus (tableau II), on verra que dans presque toutes les expériences la production de la toxine suit une marche uniforme. Elle est faible au début ; en deux jours, on ne dépasse guère une toxicité telle que la dose qui tue en quatre jours, soit $1/50$ de centimètre cube. C'est la période d'enrichissement de la culture et de formation du voile. Puis, comme l'ont bien montré Moloney et Hanna [14], le nombre des germes augmente peu ; mais l'activité de la toxine croît brusquement, en deux jours elle passe du $1/50$ en général au $1/500$. Elle continue à progresser faiblement jusque vers le huitième jour, où elle atteint le $1/700$, et baisse ensuite légèrement après le douzième jour. Il y a, sur notre milieu, entre le septième et le onzième jour un plateau qui peut commencer un peu plus tôt. La baisse est lente en général jusqu'au quinzième jour, quelquefois jusqu'au vingtième jour. Du vingtième au trentième jour le litre reste encore $1/300$ en moyenne, quelquefois $1/200$. Mais, dans cette période, il est en partie sous la dépendance de la réaction, qui se maintient autour de 8,5 si le milieu retient assez de CO_2 , et qui s'alcalinise plus fortement si CO_2 s'échappe. L'influence défavorable de la réaction est-elle partiellement compensée par une faible production de toxine ? Il ne semble pas, d'après une expérience où nous avons comparé la toxicité de la culture au trentième jour, avec celle du liquide du même ballon prélevé au treizième jour, filtré sur bougie et conservé à l'étuve ; le résultat était le même des deux côtés.

CONCLUSIONS

La condition essentielle pour préparer une toxine diphtérique très active est de posséder un *bon milieu*. Si l'on n'obtient avec certains milieux que des résultats irréguliers, ce n'est pas parce que la réaction initiale est mal ajustée, c'est parce que la composition du milieu n'est pas parfaite. Non seulement la

quantité de substances hydrocarbonées susceptibles d'être transformées en acides a une importance capitale, mais la préparation et la concentration de la peptone, le degré et le mode de putréfaction de la viande jouent un rôle décisif.

Le milieu Martin, ajusté à une réaction qui varie de P_H^+ 7,5 à 7,9 par une méthode approximative, donne des résultats très réguliers. Il fournit une toxine qui tue en moyenne en quatre jours à 1/700 de centimètre cube le cobaye de 350 grammes. Nous n'avons pas obtenu mieux en ajustant le P_H^+ à des taux précis.

On obtient des toxines de la même activité et dans les mêmes délais, en plaçant la réaction initiale à un chiffre quelconque entre P_H^+ 6,8 et 7,8 et même au-dessus de 7,8. La dose mortelle reste à peu près la même du septième au onzième jour de la culture. Au delà de 8,6 il ne paraît pas se former de toxine. Au-dessous de 6,8, l'activité de la toxine baisse fortement. Avec un P_H^+ initial de 5,8 à 6,4 on n'arrive à tuer le cobaye en quatre jours qu'avec 1/10 de centimètre cube.

Les réactions nettement acides ou alcalines ont une influence défavorable sur la conservation de la toxine. Mais cette influence n'est pas suffisante pour expliquer que l'on n'obtienne presque pas de toxine quand la réaction initiale est trop acide. Au bout de deux ou trois jours de culture cette réaction est devenue favorable, et cependant la toxine n'apparaît pas. Que s'est-il passé ? Nous instituons de nouvelles expériences pour essayer de répondre à cette question.

La marche de la réaction, sur le milieu Martin, est différente dans les premiers jours de culture selon que le point de départ est au-dessus ou au-dessous de P_H^+ 7,3 à 7,4. Quand le milieu est acide, elle va vers l'alcalinité; quand il est alcalin, elle va vers l'acidité; au bout de quatre jours, un peu plus quand le milieu est très alcalin, les courbes de réaction arrivent presque à se superposer. Nous avons dégagé quelques-uns des facteurs de ces modifications, dont nous reprenons l'étude plus complète.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ROUX et YERSIN. *Ces Annales*, **2**, p. 629, 1888 et **3**, p. 1889.
- [2] SPRONCK. *Ces Annales*, **9**, p. 758, 1895.
- [3] PARK et WILLIAMS. *Journ. of experimental Medicine*, **1**, p. 1, 1896.
- [4] L. MARTIN. *Ces Annales*, **12**, p. 26, 1898.
- [5] TH. SMITH. *Transact. Assoc. of Americ. Physic.*, 1896; et *Journ. of experimental Medicine*, **4**, p. 373, 1899.
- [6] TH. MADSEN. *Zeitschr. f. Hygiene*, **26**, p. 157, 1897 et KRAUS et LEVADITI. *Handbuch d. Technik u Methodik d. Immunitätsforschung*, **1**, p. 71, 1908.
- [7] MAC CONKEY. *Jour. of Hygiene*, **12**, p. 507, 1912.
- [8] J. W. M. BUNKER. *Journ. of Bacteriology*, **4**, p. 379, 1919.
- [9] K. G. DERNEY et H. DAVIDE. *Journ. of Pathology a. Bacteriology*, **24**, p. 150, 1921.
- [10] OTTO et HETSCH. *Die staatliche Prüfung der Heilsera*, p. 71. — G. FISCHER, Jena, 1921.
- [11] K. A. JACOBSEN. *Centralblatt f. Bakteriöl., Orig.*, **57**, p. 16, 1911.
- [12] C. LUBENAU. *Archiv f. Hygiene*, **66**, p. 305, 1908.
- [13] H. DAVIDE et G. K. DERNEY. *C. R. Réunion biolog. de Suède, C. R. Soc. de Biol.*, **85**, p. 1177, 1921.
- [14] J. P. MOLONEY et L. HANNA. *Proceed. Society for experimental Biology and Medicine*, **19**, p. 24, 1921.

DE LA VACCINATION DU COBAYE CONTRE LE SANG CHARBONNEUX

par A. BESREDKA et Y. DE TRÉVISE

Le bacille du charbon est un de ceux que l'on rencontre le plus fréquemment aux grands carrefours de la doctrine de l'immunité.

Qu'il s'agisse de l'immunité naturelle ou acquise, que celle-ci soit active ou passive, on ne manque pas de constater que ce qui est vrai pour la bactériémie souvent ne s'applique pas aux autres virus, et inversement.

Ainsi, lorsqu'en 1880 Pasteur eût découvert le principe d'atténuation pour les bacilles du choléra des poules, celui-ci fut aussitôt étendu au charbon. Or, ce principe, appliqué depuis à d'autres virus connus ou encore inconnus, ne trouva jamais d'expression aussi belle que dans le cas de la bactériémie.

Lorsqu'en 1888, Behring (1) fit la constatation, retentissante à l'époque, que le rat, animal réfractaire au charbon, possède un sérum puissamment destructeur vis-à-vis de la bactériémie, on crut tenir la clef de l'immunité anticharbonneuse et même celle de l'immunité naturelle, en général.

Vint, en 1890, le Mémoire classique de Metchnikoff (2) qui réduisit l'immunité du rat à ses justes proportions, c'est-à-dire à celles d'un fait particulier.

Lorsque, quelques années plus tard, se posa le problème de la sérothérapie anticharbonneuse, on vit de nouveau la bactériémie se singulariser au point de vue de l'immunité passive. On sait que les grands animaux, les chevaux en particulier, se laissent aisément immuniser contre la bactériémie; on arrive à leur faire tolérer, en injections intraveineuses, des litres de virus, tout comme dans le cas de toxine tétanique ou diphté-

(1) *Centralbl. f. klinische Medizin*, 1888, n° 38, p. 681.

(2) *Ces Annales*, 1890, 4, p. 193.

rique. Or le sérum anticharbonneux, obtenu dans ces conditions, protège le cobaye tout au plus contre une dose minima mortelle de virus, encore cette protection est-elle peu sûre.

Et dans un ordre d'idées analogues ne voit-on pas que les animaux de laboratoire, si faciles en général, à vacciner contre divers virus, se prêtent si difficilement à la vaccination, dès qu'il s'agit du virus charbonneux?

Rappelons, enfin, ce trait caractéristique de la bactériémie, qui a été signalé dernièrement par un de nous (1). Ce virus, si meurtrier pour le cobaye, ne s'attaque en réalité qu'à un groupe particulier de cellules, celles de la peau. Cette affinité pour le revêtement cutané du cobaye est strictement spécifique, le virus charbonneux n'ayant aucune prise sur d'autres tissus ou organes.

Tous ces faits montrent combien l'histoire du charbon est pleine d'imprévu et combien l'immunité anticharbonneuse ressemble peu à celle qui régit la plupart des microbes pathogènes.

*
..

Faudrait-il ajouter aux caractères si particuliers de la bactériémie encore celui de constituer un virus différent, suivant qu'il est cultivé dans les milieux artificiels ou qu'il est contenu dans le sang des animaux morts du charbon?

A la suite de l'expérience faite, en 1882, à l'Ecole vétérinaire de Toulouse, il a été décidé de réserver les deux tiers des animaux vaccinés pour constater, entre autres, « si les animaux vaccinés résisteront aussi bien à l'inoculation du sang charbonneux qu'à l'inoculation du virus très virulent » (2).

Si la Société d'Agriculture de Toulouse, qui a pris l'initiative de cette expérience, jugea opportun de poser cette question, ce ne fut pas par pure curiosité scientifique. C'est que les expériences instituées en différents pays, tant en France qu'à l'étranger, laissèrent planer à cet égard un certain doute. Des moutons vaccinés, puis inoculés avec de la bactériémie provenant des cultures, sortaient toujours victorieux de l'épreuve; mais, dès qu'on soumettait les animaux vaccinés à l'épreuve avec du sang charbonneux, on avait quelquefois des mécomptes.

(1) Ces *Annales*, 35, p. 421.

(2) CHAMBERLAND. *Charbon et vaccination charbonneuse*, 1883.

Dans bien des cas la cause d'insuccès résidait, comme l'a montré Pasteur, dans la présence, dans le sang inoculé, des vibrions septiques; mais, il y eut aussi des cas défavorables avec du sang non contaminé. Rappelons l'expérience de l'Ecole vétérinaire de Turin. Elle porta sur vingt bêtes vaccinées. L'épreuve fut faite avec du sang fraîchement récolté, ne renfermant que des bactériidies. Or, sur les 20 bêtes ainsi éprouvées, 9 succombèrent au charbon.

Cette expérience de Turin, bien que réalisée dans des conditions qui lui enlèvent son caractère rigoureux, est loin de la célèbre démonstration de Pouilly-le-Fort, la première en date, exécutée par Pasteur, Roux et Chamberland, où sur 25 moutons vaccinés, il n'y eut qu'une seule mort, celle d'une brebis pleine; et où, sur 24 moutons et une chèvre, témoins non vaccinés, il n'y eut pas une seule survie (1).

Certes, aucune des nombreuses expériences faites depuis, dans les divers points du globe, n'a été aussi peu heureuse que celle d'Italie.

Comment expliquer que l'immunité des animaux vaccinés fléchit quelquefois devant l'inoculation du sang charbonneux?

Est-ce une question d'ordre quantitatif ou qualitatif? En d'autres termes, l'inoculation du sang charbonneux est-elle sévère parce que massive ou parce que le virus du sang est de nature différente du virus contenu dans les cultures?

Ne serait-ce pas la capsule dont s'aurole la bactériдие dans le sang, qui, en paralysant les phagocytes, empêcherait l'animal de lutter contre l'infection? Notons que cette hypothèse relative au rôle de la capsule, s'appuyant sur des analogies empruntées à l'histoire d'autres microbes, est celle qui a le plus de crédit aujourd'hui dans les milieux bactériologiques.

*
* *

Dans une étude publiée récemment par l'un de nous, il a été montré que le cobaye, animal réceptif vis-à-vis du charbon, ne l'est en réalité qu'en raison de la réceptivité de sa peau : l'infection expérimentale du cobaye débute toujours par une cuti-

(1) *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 13 juin 1881.

infection. En parlant de ce fait, expérimentalement établi, il a été démontré qu'en procédant à la cuti-vaccination, on arrive à conférer à la peau une immunité extrêmement solide : on réalise ce que nous appelons une cuti-immunité.

La réceptivité de la peau étant levée, le cobaye tout entier devient vacciné contre le charbon.

L'extrême facilité avec laquelle, grâce à la cuti-vaccination, on peut aujourd'hui immuniser le cobaye contre le charbon, nous permet de répondre à la question qui préoccupa, en 1882, la Société d'Agriculture de Toulouse. Nous sommes à même de nous rendre compte si un animal vacciné contre la bactériémie virulente de culture l'est également contre la bactériémie contenue dans le sang.

Ayant à inoculer, dans nos expériences sur les cobayes, du sang charbonneux, nous avons décidé d'opérer exactement comme si nous avions à inoculer des bactériémies provenant d'une culture : nous procédâmes à un dosage aussi précis que possible de la virulence du produit à inoculer, c'est-à-dire du sang. Pour avoir toujours du sang de virulence sensiblement égale, nous en prélevions dans le cœur des cobayes inoculés dans des conditions identiques (avec 1/10-1/100 de culture âgée de 24 heures en bouillon, en injection sous-cutanée).

Le sang ainsi récolté tuait le cobaye neuf, sous la peau, à la dose de 1/50 à 1/100 de goutte.

Nos cobayes vaccinés avaient été tous préparés en même temps dans des conditions identiques :

29 novembre. . .	1/10 c. c.	de 1 ^{er} vaccin dans la peau.			
7 décembre. . .	1/10 c. c.	de 2 ^e	—	—	—
17 décembre. . .	1/2 c. c.	de 2 ^e	—	—	—
29 décembre. . .	1/10 c. c.	de virus dans la peau.			
11 janvier . . .	1/3 c. c.		—	—	—
18 janvier . . .	1 c. c.		—	—	—
1 ^{er} février. . .	1 c. c.		—	sous	—
8 mars	1 c. c.		—	—	—
25 avril. . . .	1 c. c.		—	—	—

Nous avons fait trois séries d'expériences comprenant chacune des cobayes vaccinés et non vaccinés. Ces expériences variaient entre elles seulement par la dose de sang inoculé.

En raison de l'uniformité des résultats obtenus, nous estimons sans intérêt d'en rapporter les détails.

Sans chercher à atteindre la limite de tolérance de nos cobayes vaccinés, nous avons constaté qu'ils supportaient sans le moindre trouble l'inoculation sous la peau de quatre gouttes de sang virulent, c'est-à-dire une quantité de virus qui représentait, au moins, deux cents doses mortelles pour un cobaye non vacciné.

De l'ensemble de nos expériences, il se dégage donc la conclusion que : *la cuti-vaccination pratiquée au moyen des bactéries provenant de cultures crée une immunité solide vis-à-vis du virus contenu dans le sang d'animal mort de charbon.*

INOCULATION DU CHARBON PAR LA MUQUEUSE CONJONCTIVALE

par MARGUERITE AÏTOFF (Pétrograd).

La question de l'inoculation des maladies microbiennes par la muqueuse conjonctivale mérite d'arrêter notre attention, surtout lorsqu'il s'agit d'une maladie très pathogène pour une espèce animale.

Ainsi la tuberculose (Calmette, Guérin, Grysez) inoculée dans les yeux du cobaye lui donne la maladie d'abord ganglionnaire, puis généralisée, sans provoquer de lésions locales. Les bacilles pesteux et morveux pénètrent aussi fort aisément par cette voie. Le virus rabique instillé dans l'œil communique la maladie. Il en est de même pour la vaccine qui donne des pustules sur la cornée, sans qu'il y ait eu la moindre lésion conjonctivale préalable (expériences en cours).

Il n'en est pas de même pour le charbon qui, bien qu'ayant été étudié à ce point de vue par plusieurs auteurs, a donné des résultats discordants. Tandis que Braunschweig (1) n'arrive pas à donner le charbon en l'inoculant dans le sac conjonctival de l'œil, Rømer (2) et Mayer (3) ont pu, semble-t-il, le donner, en inoculant non pas la culture, sur gélose ou en bouillon, mais une suspension de spores charbonneuses dans l'eau. Ces deux auteurs affirment, de plus, que l'infection par l'œil se fait d'une manière plus rapide que par la voie sous-cutanée, la mort survenant après 20-24 heures.

Cependant, en étudiant avec attention le travail de Rømer, on constate que ses expériences ne sont nullement concluantes. Le charbon inoculé, soit en culture en bouillon ou sur gélose, soit avec du sang d'un animal charbonneux, ne donne au

(1) BRAUNSCHWEIG. *Fortschritte der Medizin*, 1889, n° 24, p. 921.

(2) RØMER. *Zeitschr. f. Hygiene*, 32, 1899, p. 295.

(3) MAYER. *Münch. med. Wochenschr.*, 1900, n° 34, p. 1169.

cobaye qu'une seule fois le charbon mortel en trois jours ; dans tous les autres cas, les cobayes survivent.

Dans une autre série d'expériences, en inoculant les spores charbonneuses mélangées à de la poussière, et en frottant ce mélange sur la conjonctive, ce qui suppose la formation de petites lésions de la conjonctive, Roemer n'a obtenu que deux fois l'infection, une fois chez un cobaye et une fois chez un lapin (après 2-4 jours). Les seuls cas probants d'infection se sont produits par inoculation de la spore charbonneuse en suspension dans l'eau chez trois souris grises chez lesquelles la maladie évolua très rapidement vers la mort.

Hirota (1), en répétant les expériences précédentes, constata que sur 36 animaux inoculés dans les yeux avec du charbon, la mort survint dans 2 cas, chez une souris blanche et chez un rat, trois et cinq jours après l'inoculation.

Nos expériences ont porté sur des souris blanches, des rats, des cobayes et des lapins. Nous nous sommes servi de cultures de vingt-quatre heures sur gélose, très abondantes, que nous délayions avec quelques gouttes de sérum physiologique de manière à obtenir une émulsion très épaisse. C'est cette dernière que nous faisions pénétrer au moyen d'une pipette sur la muqueuse conjonctivale, sans la toucher, en écartant les paupières. Nous refermions ensuite les paupières et nous les maintenions rapprochées pendant quelques instants, pour empêcher le liquide de s'écouler au dehors par suite d'un clignement des paupières. Le surplus du liquide qui suintait à travers les paupières était absorbé avec du papier à filtre stérile.

Ces expériences ont porté sur 4 souris blanches, 4 rats, 8 cobayes et 2 lapins, inoculés chacun dans les deux yeux. Aucun de ces 18 animaux n'est mort et aucun n'a présenté de trouble appréciable. Le contenu du sac conjonctival a été examiné tous les jours, au moyen de frottis et d'ensemencements sur tubes de gélose.

Aucun des animaux examinés ne se montra indemne de bactériidies, dès le lendemain : un des deux yeux, au moins, contenait des microbes pendant plus de vingt-quatre heures.

La présence de la bactéridie dans les sacs conjonctivaux a

(1) HIROTA. *Centralbl. f. Bakter*, 31, 1902, p. 223.

pu être constatée pendant une période variant entre vingt-quatre heures et sept jours, temps limite de conservation des bactériidies dans les yeux. Dans la majorité des cas, les bactériidies disparaissaient au deuxième ou troisième jour (dix-huit fois) [voir tableau].

Pour nous rendre compte si les phagocytes interviennent dans la disparition des microbes, nous avons essayé d'agir sur les leucocytes, en inoculant dans le sac conjonctival une solution de 1 p. 100 d'éthocaïne, une demi-heure avant d'y introduire l'émulsion de microbes. L'infection n'eut néanmoins pas lieu; la disparition des microbes dans un des deux yeux ne survint qu'au bout de six jours. Chez un autre cobaye, nous modifiâmes l'expérience : après avoir injecté une solution d'éthocaïne dans les deux yeux, nous avons cautérisé, dix minutes après, la muqueuse avec le bout d'une pipette porté au rouge; une demi-heure après, nous inoculâmes dans les yeux notre émulsion épaisse de bactériidies. De petites phlyctènes apparurent sur les conjonctives; l'animal resta néanmoins bien portant et les bactériidies disparurent au bout de vingt-quatre heures d'un œil, au bout de 3 jours de l'autre.

Enfin, chez un cobaye présentant une lésion accidentelle de l'œil, une taie avec une conjonctive fortement œdématiée et une ulcération de la cornée, nous avons inoculé des bactériidies dans les deux yeux. Tandis que dans l'œil sain nous retrouvions les bactériidies jusqu'au sixième jour, l'œil malade présentait une culture presque pure de staphylocoques, où dès le lendemain il nous fut impossible de retrouver une seule bactériдие.

En nous basant sur le fait que le sang charbonneux est encore plus virulent que les cultures sur gélose ou sur bouillon et que les bactériidies dans le sang sont entourées d'une capsule les rendant plus résistantes à la phagocytose, nous avons instillé dans les yeux de souris blanches et de cobayes (animaux les plus sensibles au charbon) du sang prélevé dans le cœur d'un cobaye mort de charbon et très riche en bactériidies. Des 6 souris inoculées avec du sang charbonneux dans les deux yeux, aucune n'a présenté le moindre trouble local, ni général.

Des 8 cobayes inoculés avec du sang charbonneux, 2 ont succombé, l'un au troisième jour et l'autre au cinquième jour

**Inoculation de culture de bactériidies charbonneuses
dans le sac conjonctival.**

N ^{os}	OEIL	MATÉRIEL INOCULÉ	COMBIEN DE JOURS on retrouve des bactériidies	RÉSULTATS
Souris blanches.				
1	dr. g.	Emulsion de culture sur gélose.	2 jours. 3 —	Bien portante.
2	dr. g.	—	3 — 2 —	—
3	dr. g.	—	2 —	—
4	dr. g.	—	4 — 3 —	—
Rats blancs.				
1	dr. g.	—	1 — 2 —	Bien portant.
2	dr. g.	— 2 —	—
3	dr. g.	—	3 — 3 —	—
4	dr. g.	—	2 — 4 —	—
Lapins.				
1	dr. g.	—	7 — 3 —	Bien portant.
2	dr. g.	—	2 — 2 —	—
Souris blanches.				
N ^{os}	MATÉRIEL INOCULÉ		RÉSULTATS	La bactérie ne se retrouve pas au delà de 24 heures dans le sac conjonctival.
5	Sang charbonneux dans les deux yeux.		Bien portante.	
6	—	—	—	
7	—	—	—	
8	—	—	—	
9	—	—	—	
10	—	—	—	

Cobayes.

N ^{os}	OËIL	MATÉRIEL INOCULÉ	REACTION LOCALE	COMBIEN DE JOURS on retrouve des bactériidies	RÉSULTATS
1	dr. g.	Emulsion de culture sur gélose.	Aucune.	3 jours. 2 —	Bien portant.
2	g.	—	—	2 jours.	Id.
3	g.	—	—	1 jour.	Id.
4	g.	—	—	1 jour.	Id.
5	dr. g.	Emulsion de culture très épaisse, for- mant magma.	—	4 jours. 6 —	Id.
6	dr. g.	—	Conjonctivite membraneuse	Staphylocoques.	Id.
7	dr. g.	10/0 éthocaïne, 20 mi- nutes après, émul- sion de bactériidies.	Aucune. Taie, conjonc- tivite, œdème.	6 jours. Staphylocoques.	Id.
8	dr. g.	1 0/0 éthocaïne, 10' apr. brûlure; 10' apr. émulsion de bactér.	Phlyctènes, petits ulcères Id.	Staphylocoques. 3 jours.	Id.
9	dr. g.	1 goutte de sang charbonneux.	—	† 3 j. après. Fem. pleine. Charbon gé- néralisé.
10	dr. g.	—	—	1 jour.	Bien portant.
11	dr. g.	—	—	1 jour.	Id.
12	dr. g.	—	—	Id.
13	dr.	—	—	1 jour.	Id.
14	dr. g.	—	—	1 jour.	Id.
15	dr.	—	—	1 jour.	Bien portan- te, pleine.
16	dr. g.	—	—	† 5 j. après. Charb. gén. Fem. pleine.

avec une infection généralisée. Il s'agissait dans les deux cas de femelles pleines.

Des 6 autres cobayes, une encore était une femelle pleine; elle resta indemne, peut-être du fait d'avoir été inoculée dans un seul œil ou bien de s'être trouvée dans un état de grossesse peu avancée. Les 5 autres mâles ont été inoculés avec du sang charbonneux : 4 dans les deux yeux et 1 dans un seul œil. Tous restèrent indemnes. Les bactériidies ont été retrouvées chez eux dans le contenu du sac conjonctival pendant un temps ne dépassant pas vingt-quatre heures.

*
*
*

Nous pouvons conclure de nos expériences que la muqueuse conjonctivale offre une barrière infranchissable non seulement pour les bactériidies provenant de cultures sur gélose ou en bouillon, mais aussi pour celles considérées comme beaucoup plus virulentes, parce que entourées de capsule, provenant du sang d'animaux morts du charbon.

Comme seule exception à cette règle, nous pouvons citer les femelles pleines; leur résistance à l'inoculation de sang charbonneux sur la muqueuse conjonctivale semble diminuée.

La cautérisation artificielle de la muqueuse, ainsi que les ulcérations accidentelles de cette muqueuse, loin d'activer l'infection, provoquent, au contraire, la disparition rapide de la bactériдие à la faveur de l'apparition de microbes banaux, tels que les staphylocoques.

L'instillation d'éthocaïne dans l'œil, quoique provoquant un ralentissement de la phagocytose, n'est pas suivie de pénétration des bactériidies dans le système lymphatique ou sanguin. (La solution d'éthocaïne n'est pas toxique pour les bactériidies : celles-ci se développent sur gélose imprégnée de cette substance.)

Le mécanisme de la non-infection du charbon par la muqueuse conjonctivale peut tenir, en partie, aux conditions purement mécaniques, l'œil se débarrassant des particules étrangères par le liquide lacrymal et le clignement des paupières, et surtout, à des phénomènes d'ordre chimique, qui tout

en conservant la bactériodie intacte et virulente jusque pendant sept jours dans le sac conjonctival, ne lui permettent pas de pénétrer dans l'organisme : nous assistons à un phénomène d'immunité naturelle locale dont le mécanisme intime reste à déterminer.

(Laboratoire du professeur Besredka.)

SUR UN NOUVEAU GENRE DE *METCHNIKOVELLIDÆ*

par V. A. DOGIEL,

Professeur de Zoologie à l'Université de Pétrograd.

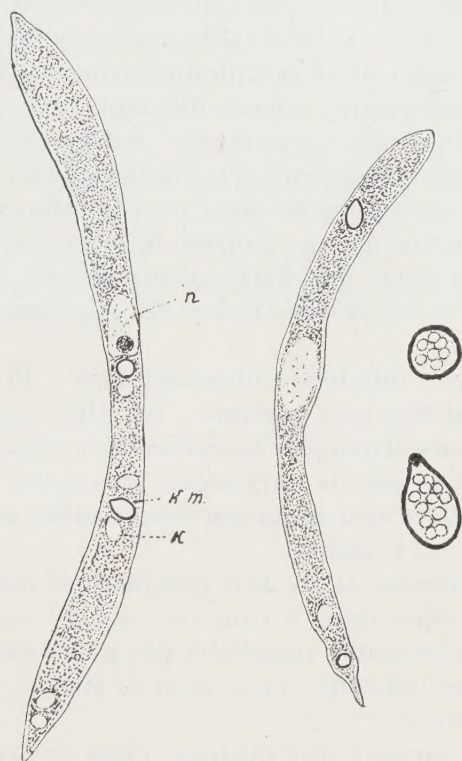
En 1919, Caullery et Mesnil (1) ont publié leur mémoire sur les curieux parasites des Grégarines, qu'ils réunissent sous le nom de *Metchnikovellidæ*, groupe de Protistes inférieurs dont les affinités systématiques restent encore douteuses. Le mémoire cité représente le résultat d'observations de plusieurs années (vingt et un ans), faites sur un grand nombre de grégarines habitant dans le tube digestif de diverses Annélides Polychètes. En comparant les descriptions de formes diverses de *Metchnikovellidæ*, données par Caullery et Mesnil, avec mes propres observations faites il y a quelques années à la station biologique de Mourman (golfe de Kola), je vois que j'ai eu affaire à une forme nouvelle de ces parasites. D'après les caractères de ses kystes, cette forme doit former un genre nouveau de *Metchnikovellidæ*.

La forme décrite ici vit en parasite dans l'endoplasme d'une espèce de *Selenidium* qui se trouve attachée à la paroi de l'intestin de *Travisia forbesi*. Cet Annélide existe en grande quantité dans la vase de la côte, découvrant à marée basse, tout près du bâtiment de la station biologique de Mourman.

Le stade observé du parasite était celui de kystes. C'est juste le stade qui a servi (et avec raison) à Caullery et Mesnil pour grouper les différentes espèces de *Metchnikovellidæ* en trois genres. Les kystes de l'espèce mourmanienne ont la forme d'un œuf quelque peu allongé à son bout étroit, ou plutôt d'une petite bouteille. Une extrémité de la bouteille étant arrondie, l'autre s'effile en un court col. Le kyste possède une paroi épaisse à double contour et présente à son bout étroit un petit épaississement-bouchon, observé déjà par les auteurs français chez d'autres *Metchnikovellidæ*. La même ressem-

(1) Ces *Annales*, t. 33, p. 209.

blance se montre dans le mode d'action sur le kyste des matières colorantes, qui ne pénètrent dans le kyste qu'avec une grande difficulté. C'est à cause de cela que les kystes présentent souvent des plis irréguliers. Chaque kyste contient de 8 à 12 petits corpuscules arrondis (spores); le dernier nombre caractérise



Caulleryetta mesnili dans un *Selenidium*, grégarine de l'intestin de l'annélide *Travisia forbesi*.

n, noyau; *k. m.*, kystes mûrs; *k*, kystes à parois minces.

évidemment des kystes parfaitement mûrs. A l'état vivant, on peut distinguer deux sortes de kystes: les uns parfaitement mûrs ont, comme je l'ai dit, des parois épaisses et des spores bien visibles. Les autres sont au contraire plus transparents, à parois minces et à contours qui ne sont pas bien définis; leur contenu n'est pas bien différencié en spores. Le corps de la grégarine-hôte est tellement étroit que les kystes sont rangés

en une seule file ; ils sont disposés, sans ordre apparent, dans la partie prénucléaire ainsi que dans la partie post-nucléaire de l'hôte.

La description donnée ne laisse aucun doute que nous avons devant nous un représentant de la famille des *Metchnikovellidæ*. Mais tandis que tous les *Metchnikovellidæ* décrits jusque-là ont des kystes dont les deux pôles sont semblables, chacun avec un épaississement, le parasite du *Selenidium* de la *Travisia* a un kyste hétéropolaire, à bouts différents, avec un seul bouchon. Cela donne à penser que la sortie des spores se fait ici par un bout du kyste seulement (celui du bouchon). Ce caractère bien constant me permet de créer pour la forme de Mourman un genre nouveau que je propose de nommer *Caulleryetta mesnili* en l'honneur des deux auteurs qui les premiers ont attiré l'attention des protistologistes sur ce groupe de parasites unicellulaires.

Les grégaires infectées contenaient de 5 à 10 *Caulleryetta* et paraissaient être bien portantes, car elles présentaient les mouvements caractéristiques des *Selenidium*. Chez l'une d'elles, le noyau n'avait pas de caryosome, mais cette particularité peut être constatée chez des grégaires normales aussi bien que chez les individus parasités.

En ce qui concerne la position systématique des *Metchnikovellidæ*, la question reste, à mon avis, encore non élucidée, à cause de la connaissance imparfaite que nous avons non seulement des stades végétatifs, mais aussi de tout le cycle évolutif de ces organismes.

Il me reste encore à dire quelques mots en défense de mes observations, faites sur *Schizocystis sipunculi*. En faisant l'analyse de mon travail, Caullery et Mesnil partagent l'opinion de Brasil et Fantham, que les états de schizogonie observés par moi chez *Schizocystis sipunculi* « paraissent bien plutôt représenter un parasite de l'endoplasme de la grégarine ». Contre cette supposition, je peux avancer les arguments suivants : 1° la schizogonie étant indubitablement observée par Léger et d'autres chez des grégaires variées, et présentant des aspects bien divers, mes données n'ont *a priori* rien d'in vraisemblable ; 2° les corpuscules vus par moi à l'intérieur de *Schizocystis* à l'état de propagation sont clairement grégariniformes, et ils

ont de plus l'aspect des grégarines monocystidées (comme la cellule-mère); 3° les *Schizocystis sipunculi*, ressemblant bien au genre *Selenidium*, se distinguent des autres grégarines de l'intestin des Polychètes par leur répartition dans le tube digestif. Tandis que les *Selenidium* se rencontrent isolément, les *Schizocystis* se trouvent toujours par centaines, groupées en masses épaisses, contenues dans de petits diverticules de l'intestin produits par les parasites. La présence même de tels amas fait penser aux affinités des *Schizocystis* et des Schizogrégarines; d'autre part ces groupements sont expliqués précisément par la reproduction asexuelle répétée du parasite dans le tube digestif de l'hôte, que j'ai observée. On peut contester l'attribution de la forme décrite au genre *Schizocystis*, mais la présence d'une schizogonie endogène chez la forme en question est incontestable.

Le Gérant : G. MASSON.

